

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

000934123

WPI Acc No: 1973-11348U/197309

**Ampholyte (mixt) - for focussing electrophoresis**

Patent Assignee: GRUBHOFER N (GRU -I); GRUBHOFER N (GRUB-I)

Number of Countries: 004 Number of Patents: 005

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 2137617	A					197309 B
US 3770603	A					197347
CH 561291	A	19750430				197521
GB 1402751	A	19750813				197533
DE 2137617	B	19780427				197818

Priority Applications (No Type Date): DE 2137617 A 19710728; DE 2230743 A 19720623

Abstract (Basic): DE 2137617 A

The ampholyte (mixt.) contains a substance whose basic part contains not <4 primary/secondary/tertiary amino gps. and whose acidic part contains not <sulphonic ester of S-ester gp. per molecule.

Title Terms: AMPHOLYTE; MIXTURE; FOCUS; ELECTROPHORESIS

Derwent Class: E16

International Patent Class (Additional): C07C-143/00; C07G-007/00;

C08B-019/02; C08F-027/16; C25B-003/00; C25B-007/00

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): E10-A09B; E10-B04B

Chemical Fragment Codes (M3):

\*01\* K0 M210 M211 M212 M213 M214 M215 M216 M231 M270 M281 M311 M312 M313  
M314 M315 M316 M332 M334 M321 M320 M280 M342 M340 M360 M391 C216  
F310 K431 K432 K441 H603 M620 H721 H713 M510 M520 M521 M530 M540  
M782 R023 R024 M413 M416 M902  
\*02\* H1 M282 M283 M210 M220 M225 M226 M231 M232 M233 M270 M281 M311 M312  
M313 M314 M315 M316 M332 M334 M323 M280 M342 M340 M380 M393 L721  
L722 L723 L724 H182 H183 M620 M510 M520 M530 M540 M782 R023 R024  
M416 M902

Ring Index Numbers: 00131; 70010

⑤

Int. Cl. 2:

C 07 C 143/14

⑤ BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

DEUTSCHES



PATENTAMT

DE 21 37 617 C 3

⑪

## Patentschrift 21 37 617

⑫

Aktenzeichen: P 21 37 617.0-42

⑬

Anmeldetag: 28. 7. 71

⑭

Offenlegungstag: 16. 2. 73

⑮

Bekanntmachungstag: 27. 4. 78

⑯

Ausgabetag: 4. 1. 78

Patentschrift stimmt mit der Auslegeschrift überein

⑰

Unionspriorität:

⑳ ㉑ ㉒

⑱

Bezeichnung:

Verfahren zur Herstellung wäßriger Ampholytlösungen oder deren Gemischen

㉒

Patentiert für:

Grubhofer, Nikolaus, Dr., 6900 Heidelberg

㉓

Erfinder:

Grubhofer, Nikolaus, Dipl.-Chem. Dr.; Pogacar, Peter, Dipl.-Chem. Dr.;  
6900 Heidelberg

㉔

Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:

GB 11 21 641

Bei der Bekanntmachung der Anmeldung ist  
ein Versuchsbericht S. 1-4, eingeg. am  
24.03.77, ausgelegt worden.

DE 21 37 617 C 3

us 3770603  
GB 143 8744

## Patentanspruch:

Verfahren zur Herstellung wäßriger Ampholytlösungen oder deren Gemischen, dadurch gekennzeichnet, daß man

- a) eine wäßrige Lösung von Pentaäthylenhexamin oder
- b) eine wäßrige Lösung von Pentaäthylenhexamin, die mit Dimethylsulfat oder in methanolischer Lösung mit Alkylhalogeniden teilweise quaternisiert und anschließend mittels eines Anionenaustauschers von sauren Umsetzungsprodukten befreit worden ist,

mit Propansulton oder Bromäthansulfonsäure in an sich bekannter Weise umsetzt und in üblicher Weise mittels Elektrophorese aufträgt.

Die Erfindung betrifft ein im vorstehenden Anspruch aufgezeigtes Verfahren zur Herstellung wäßriger Ampholytlösungen oder deren Gemischen. Diese Lösungen bestehen aus Substanzen, die in ihrem Molekül sowohl saure als auch basische Ladungszentren enthalten, deren Ladungszustand vom pH des umgebenden Milieus abhängig ist, so daß sie einen wohl definierten isoelektrischen Punkt aufweisen, sowie auch aus einer Mischung einer Vielzahl von Ampholyten mit variierendem Verhältnis von positiven und negativen Ladungen und daher verschiedenen isoelektrischen Punkten.

Die Aufgabe eines solchen Ampholytgemisches besteht darin, den in einem gegen Konvektion (beispielsweise durch ein Gel) stabilisierten Elektrolyten zwischen zwei Elektroden bei Anlegen einer hohen Gleichspannung entstehenden pH-Gradienten so gleichmäßig und stabil zu machen, daß damit das Trennverfahren der fokussierenden Elektrophorese möglich wird.

Die wäßrige Lösung eines Ampholyten mit einem definierten pH zeigt in Abwesenheit anderer Elektrolyte ein ganz bestimmtes pH, nämlich dasjenige des isoelektrischen Punktes. Im elektrischen Feld wandert ein solcher Elektrolyt nicht, weil er nach außen keine sichtbare Ladung trägt. Ein Gemisch von vielen Elektrolyten mit definiertem pH zeigt ebenfalls ein bestimmtes pH, das aber nun Ergebnis einer Summierung ist und bei welchem die wenigsten Elektrolyte im nach außen ungeladenen Zustand vorliegen. Legt man an solche Lösung eine Gleichspannung, so werden die Elektrolyte ihrer Ladung entsprechend wandern, und ein beträchtlicher Strom fließt. Sorgt man nun dafür, daß von der Kathode her OH-Ionen und von der Anode her H-Ionen in den gegen Konvektion stabilisierten Elektrolyt einwandern, so werden diese mit den schwach dissoziierenden Ampholyten reagieren und deren Ladungszustand ändern.

Im Zuge dieses Vorgangs wird dann auch einmal der isoelektrische Punkt jedes einzelnen Ampholyten erreicht, so daß dieser seine Wanderung einstellt. An dieser Stelle herrscht dann das pH, welches dem pI des betreffenden Elektrolyten entspricht, als ob er allein in der Lösung wäre. Wenn der geschilderte Zustand für alle Komponenten des Gemisches erreicht ist, wird in dem stabilisierten Elektrolytgemisch nur noch ein sehr geringer Strom fließen, die Erzeugung von H- und

OH-Ionen an den Elektroden wird minimal sein, und der »pH-Gradient«, der sich in dem Milieu ausgebildet hat, bleibt über längere Zeit stabil.

Man hat also eine elektrophoretische Fraktionierung dieses Vielkomponenten-Gemisches erreicht, wobei die Ausbildung des pH-Gradienten eigentlich nur ein Nebenprodukt ist. Ganz ähnlich wie eines dieser Ampholytkomponenten wird sich auch ein Protein verhalten, das man zu der Lösung gibt. Entsprechend seinem isoelektrischen Punkt wandert es von beiden Seiten der Trennstrecke her zu einer scharf definierten Zone zusammen, eine Erscheinung, die dem Verfahren die Bezeichnung »fokussierende Elektrophorese« eingetragen hat und die sich vorteilhaft von der konventionellen Elektrophorese abhebt, bei der die einzelnen Komponenten, obwohl sie an einer scharf definierten Stelle aufgetragen sind, im Laufe ihrer Wanderung immer weiter auseinander diffundieren. Mehrere Proteine werden entsprechend aufgetrennt an verschiedenen Stellen der Trennstrecke erscheinen. Die theoretische Ausarbeitung dieses Verfahrens und die ersten guten Trennergebnisse an Eiweißkörpern mit Hilfe eines Ampholytgemisches, das aus Peptiden und Aminosäuren besteht, verdankt man H. Svensson: Acta Chim. Scand. 15, 325–341 (1961); Acta Chim. Scand. 16, 456–466 (1962); Biochem. Biophys. Suppl. 1, 132–138. Es ist bekannt, daß Ampholytgemische durch Kondensation von aliphatischen Polyäthylenpolyaminen mit Acrylsäure erzeugt werden können (USA-Patentschrift 21 46 219 und USA-Patentschrift 21 95 947, dort insbesondere Beispiel 21).

Es ist schließlich bekannt, daß solche Umsetzungsprodukte von Polyaminen mit Acrylsäure für die fokussierende Elektrophorese von Proteinen verwendet werden können (O. Vesterberg, Acta Chim. Scand. 23, 2653 [1969], schwedische Patentschrift 11 06 818).

Die bisher für die fokussierende Elektrophorese benutzten Ampholyte enthalten als basische Zentren primäre, sekundäre und tertiäre Aminogruppen sowie als saure Zentren die Carboxylgruppen.

Ampholyte der beschriebenen Art haben die folgenden Nachteile:

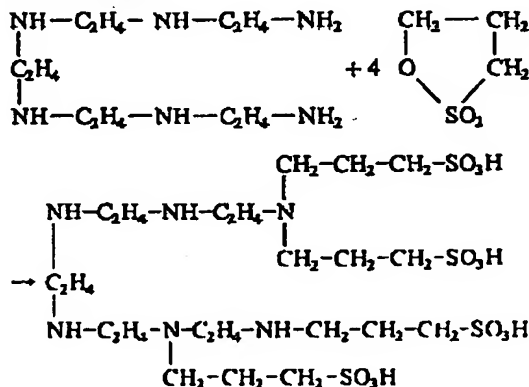
1. Die Verwendung von Carboxylgruppen macht es schwierig, die isoelektrischen Punkte niedriger als etwa pH 3,5 zu bringen. pH-Gradienten unterhalb dieses Bereiches sind also mit solchen Ampholyt-Mischungen nicht zugänglich.
2. Isoelektrische Punkte über 10 sind mit primären, sekundären oder tertiären Aminogruppen schwer zu erreichen. pH-Gradienten oberhalb dieses Gebietes können also mit derartigen Ampholyten nicht erzeugt werden.
3. Die Verwendung von Carboxylgruppen birgt grundsätzlich Störungsmöglichkeiten in biologischen Systemen, hauptsächlich weil sie die Eigenschaft haben, unlösliche Verbindungen oder Komplexverbindungen mit mehrwertigen Metall-Kationen einzugehen, insbesondere mit Ionen des Calciums oder Magnesiums, aber auch, und zwar in verstärktem Maße, mit Kupfer oder Zink, wie sie im biologischen Untersuchungsmaterial vorkommen.

Es wurde nun festgestellt, daß man für die fokussierende Elektrophorese geeignete Ampholyt-Mischungen auch dadurch erzeugen kann, daß man in ein aliphatisches Polyamin Sulfonsäuregruppen anstelle der Carboxylgruppen einführt. Weiterhin wurde festgestellt, daß man die Basizität der Aminogruppen durch Reaktion mit geeigneten Alkylierungsmitteln erhöhen kann, ohne daß

die Synthese des Ampholytgemisches gestört wird.

Eine solche Mischung aus Aminosulfonsäuren wird durch Umsetzung des im Handel leicht erhältlichen Pentaäthylenhexamins mit Propansulton hergestellt. Propansulton ist das  $\gamma$ -Sulton der 3-Hydroxy-1-propan-sulfonsäure, welches primäre und sekundäre Amine gemäß nachstehendem Schema zu alkylieren vermag.

Formelschema:



Man ersieht aus diesem Schema, daß eine ganze Anzahl verschiedener amphoterer Produkte entstehen können, wobei die isoelektrischen Punkte um so mehr im sauren Bereich liegen werden, je mehr Moleküle Propansulton mit dem Amin-Molekül zur Reaktion gebracht werden. Die Reaktion der Partner vollzieht sich auf an sich bekannte Weise (vgl. britische Patentschrift 1121 641, Ansprüche 18 und 19 sowie insbesondere Seite 11, Beispiel XXXV), nur daß in wäßriger Verdünnung gearbeitet wird, wobei Selbsterwärmung erfolgt. Zum Schluß wird eine Stunde auf 65°C erhitzt.

Die so erhaltenen Reaktionsgemische müssen zunächst in mehrkammrigen Elektrophoresegeräten gereinigt und fraktioniert werden. Auch läßt sich nicht mit einem einzigen Reaktionsansatz das ganze benötigte pH-Gebiet überstreichen, sondern es müssen mehrere Ansätze mit verschiedenen Mol-Verhältnissen der Reaktionspartner miteinander kombiniert werden.

Des weiteren können solche Polymere erfindungsgemäß vor dieser Umsetzung noch durch neutrale Alkylierungsmittel, wie Dimethylsulfat, teilweise quaternisiert werden. Die Wahl der Reaktionsbedingungen kann dabei in erheblichen Grenzen variiert werden. Die entstandenen Reaktionsprodukte werden dann erforderlichenfalls miteinander vermischt, so daß die Mischung eine sehr große Anzahl von Ampholyten mit verschiedenen eng beieinander liegenden isoelektrischen Punkten enthält. Die große Variationsbreite in der Wahl der Reaktionsbedingungen bei der erfindungsgemäßen Synthese solcher Ampholyte stellt einen besonderen Vorteil des Verfahrens dar.

Die Analysenmethode für die erhaltenen Ampholytmischungen besteht in bekannter Weise darin, daß man deren wäßrige Lösung in einem die Konvektion verhindernden Dextran-Gel mit Schwammstruktur aufnimmt und in einer Dünnschicht auf Glas elektrophoretisch auftrennt. Dabei wurde zu 7,5 ml einer 2%igen wäßrigen Lösung des Reaktionsgemisches 0,6 g vernetztes Dextran-Pulver, Korngröße 50  $\mu$ , gegeben und 12 Stunden lang quellen gelassen. Die Suspension wurde

dann auf einer Glasplatte mit den Abmessungen 50x200 mm verstrichen, auf der sie nach einigen Minuten zu einer gleichmäßigen Schicht verlief, deren Dicke sich nach Wegdunsten eines Teiles des Wassers auf ca. 0,2 mm belief. Die Platte wurde in einer gekühlten Kammer an beiden Enden der 200 mm langen Trennstrecke mit je einem 10 mm breiten Streifen aus Filterkarton belegt, der für die Kathode (negativ) mit 1% NaOH und für die Anode (positiv) mit 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getränkt war. Auf die so getränkten Kartonstreifen wurden Elektrodendrähte aus Platin gebracht und eine entsprechende Gleichspannung angelegt, die anfangs 200 V betrug und im Laufe von 6 Stunden bis auf 600 V gesteigert wurde. (Einzelheiten: Vgl. B. Radola, Biochimica et Biophysica Acta 194, 335-338 [1969].)

Zur Bestimmung des pH-Verlaufes längs der Trennstrecke wurde nach Beendigung der Elektrophorese die auf der Glasplatte liegende Schicht quer zur Trennstrecke in einzelne Streifen geteilt, und zwar so, daß man mit dem Spatel Striche in Abständen von 10 mm ritzte, so daß also Felder mit den Abmessungen 10x50 mm erhalten wurden. Man hob nun das auf den einzelnen Feldern enthaltene Material mit dem Spatel ab, überführte es in Reagenzgläser und übergießte es mit 3 ml Wasser. Sodann wurde das pH gemessen. Die Resultate wurden graphisch aufgetragen (Fig. 1+2).

Aus Fig. 1 ersieht man die Ergebnisse der pH-Messungen längs der Trennstrecke für Aminosulfonsäure-ampholyte mit schmalen pH-Bereich, die durch Zweit-Elektrophorese nach Beispiel 6 gewonnen wurden, und zwar:

- 1-pH-Fraktionen (2-2,9)+(3-3,9), Hauptbereich: 2-4
- 1-pH-Fraktionen (5-5,9)+(6-6,9), Hauptbereich: 5-7
- ▽ 1-pH-Fraktionen (7-7,9)+(8-8,9), Hauptbereich: 7-10

Man sieht hier über den Hauptbereich hinweg einen relativ flachen pH-Anstieg, der an den Rändern steil in das ganz saure bzw. alkalische Milieu um die Elektroden übergeht.

Fig. 2 zeigt die Ergebnisse der pH-Messungen längs der Trennstrecke für Aminosulfonsäure-ampholyte mit einem breiten pH-Bereich, welche nach Beispiel 7 gewonnen wurden. Sie zeigt auch die Ausbildung des pH-Gradienten von der Intensität der Elektrophorese abhängt.

— — — — — Kurve 2

Der pH-Gradient erscheint im Hauptbereich von 3-10 unter denselben Elektrophorese-Bedingungen, die für die Gewinnung der Resultate von Fig. 1 angewandt wurden.

..... Kurve 1

Der pH-Gradient beginnt sich erst auszubilden.

————— Kurve 3

Langsames Verschwinden des pH-Gradienten bei intensiver Fortsetzung der Elektrophorese.

Die fokussierende Elektrophorese an der Dünnschicht gestaltet sich so, daß in der Mitte der Trennstrecke, also je 100 mm von den Rändern der Platte entfernt, die Lösung des Untersuchungsmaterials als

definierter, ca. 3 mm und 20 mm langer Strich auf das Gel gegeben wurde. Nach Beendigung der Elektrophorese legt man einen Streifen Filterpapier auf das Gel, so daß die Elektrolytlösung zusammen mit den fraktionierten Proteinen darin aufgesaugt wird. Der Streifen wird bei 100°C getrocknet und dann in einer Farbstofflösung gelegt, welche Proteine, jedoch nicht die Cellulose des Papiers anfärbt und auch nicht die Proteine auflöst. Anschließend wird der Farbstoff mit einer wäßrigen Lösung herausgewaschen, welche Proteine färbt, beispielsweise Trichloressigsäure, so daß die gefärbten Zonen auf dem Papier fixiert bleiben. Nun hat man auf diesem Muster der durch fokussierende Elektrophorese aufgetrennten Proteine in Form farbiger Banden vorliegen.

Zum anwendungstechnischen Fortschritt:

Das Kriterium für die Brauchbarkeit der erfindungsgemäß hergestellten Ampholytgemische besteht letztendlich in der Brauchbarkeit für den vorgesehenen Verwendungszweck, nämlich für fokussierende Elektrophorese von Proteinen. Hier spielt das niedrige Molekulargewicht eine Rolle (das höchstmögliche theoretische Molekulargewicht für ein Hexa-Substitutionsprodukt liegt bei  $M = 866$ ). In 10%iger Trichloressigsäure sind die Ampholytgemische beispielsweise in einer Konzentration bis zu 15% klar löslich. Dadurch können sie mit diesem die Proteine füllenden Mittel aus den Abklatschstreifen herausgewaschen werden und bedingen keine Untergrundfärbung.

Weiterhin kann durch geeignete Kombination der einzelnen Ansätze eine weitgehend lineare Verteilung der pH-Gradienten entlang der Trennstrecke erzielt werden. Der anwendungstechnische Fortschritt eines erfindungsgemäß hergestellten Ampholytgemisches (s. Beispiele 6 und 7 bzw. Fig. 1 und 2) gegenüber einem bekannten Aminocarbonsäureampholyt als Vergleichssubstanz wird nun an der Trennung eines Proteingemisches durch isoelektrische Fokussierung im mitausgelegten Versuchsbericht aufgezeigt. Die Testmischung, die Proteine mit verschiedenem isoelektrischem Punkt enthält, hat folgende Bestandteile:

Protein	Isoelektrischer Punkt
Amyloglucosidase	3,3
Ferritin	4,4
Serumalbumin	4,7
$\beta$ -Lactoglobulin	5,1
Conalbumin	5,9
Myoglobulin (Pferd)	7,3
Myoglobulin (Wall)	8,3
Ribonuclease	9,5
Cytochrom C	10,6

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung der wäßrigen Lösungen von Ampholyten oder deren Gemischen sowie die elektrophoretische Analyse der erfindungsgemäß hergestellten Ampholytgemische wird an Hand der folgenden Beispiele beschrieben.

#### Beispiel 1

(Herstellung des Ausgangsstoffs)

464 g (2 Mol = 12 Atom N) Pentaäthylenhexamin werden in 2 Litern Methanol gelöst mit 252 g (2 Mol) Dimethylsulfat versetzt und 4 Stunden unter Rückfluß

gekocht. 5 Liter Wasser werden zugesetzt und die Lösung zur Entfernung der Methylschwefelsäure durch eine Säule mit stark basischem Anionenaustauscher (Styrol-Divinylbenzol-Basis mit quaternären Ammoniumgruppen) geschickt. Dazu werden in eine mit einem groben Filtertuch unten abschließende Chromatographiesäule von 100 mm Innen-Ø und 700 mm Länge 5 Liter des vorgenannten Anionenaustauschers (Vernetzungsgrad 8%, Körnung 0,8 bis 1 mm) eingeschlämmt. Das Härtz wird vor der Verwendung mit 10 Litern 2 n-Natronlauge von oben nach unten durchgewaschen und anschließend mit 20 Litern Wasser gewaschen. Nunmehr wird die Reaktionslösung im Laufe von 30 Minuten von oben durch die Säule geschickt. Sobald der Auslauf alkalisch zu reagieren beginnt, wird er aufgefangen. Man spült noch mit 5 Litern Wasser nach und erhält ca. 8 Liter Filtrat. Dieses Produkt wird auf ca. 2 Liter im Wasserstrahlvakuum eingedunstet und kann dann gemäß Beispiel 3 weiterverarbeitet werden.

#### Beispiel 2 (erfindungsgemäß)

In einem 5-Liter-Drehkolben, der mit Rückflußkühler, Rührer und geheiztem Tropfrichter ausgerüstet ist, werden 446 g (2 Mol = 12 Atom N) Pentaäthylenhexamin verdünnt mit 1850 g Wasser. Die in nachstehender Tabelle jeweils angegebene Menge geschmolzenen Propan-sulfons wird langsam unter Rühren zulaufen lassen, wobei die Temperatur des Reaktionsgemisches bis auf 65°C ansteigt. Anschließend wird noch weiter eine Stunde lang diese Temperatur gehalten; dann abkühlen gelassen und mit Wasser auf einen Gesamtstoffgehalt von 2% verdünnt, also insgesamt auf 60 Liter Flüssigkeit.

Beispiel	Gramm Propan-sulton pro 446 g Pentaäthylenhexamin	Mol Propan-sulton pro Atom N	Haupt-pH-Gebiet vgl. Beispiel 5
2a	292	0,2	9,5-10,5
2b	483	0,33	7,5-9
2c	726	0,5	3,5-8
2d	980	0,67	4-6
2e	1171	0,8	2,5-4

#### Beispiel 3

(erfindungsgemäß)

Der aus Beispiel 1 erhaltene Ansatz, welcher fast die gesamte eingesetzte Menge Pentaäthylenhexamin (464 g = 2 Mol = 12 Atom N) enthält, wird analog zu Beispiel 2 mit den in nachstehender Tabelle genannten Mengen geschmolzenen Propan-sulfons unter Rühren versetzt. Die Temperatur des Reaktionsgemisches wird auf 65°C erhöht und bleibt dort eine Stunde lang. Dann wird mit Wasser auf 60 Liter Flüssigkeit verdünnt.

Beispiel	Gramm Propan-sulton pro 446 g Pentaäthylenhexamin	Mol Propan-sulton pro Atom N	Haupt-pH-Gebiet vgl. Beispiel 5
3a	146	0,1	10-12
3b	292	0,2	9,5-11

### Beispiel 4 (erfindungsgemäß)

464 g (2 Mol = 12 Atom N) Pentaäthylenhexamin und 3 Liter Methanol werden mit der in nachstehender Tabelle angegebenen Menge Bromäthansulfonsäure versetzt und 4 Stunden unter Rückfluß gekocht. 5 Liter Wasser werden zugesetzt und die Lösung zur Entfernung des Bromid-Ions durch eine Säule mit stark basischem Anionenaustauscher gegeben (analog Beispiel 1). Für den Ansatz mit 1130 g Bromäthansulfonsäure muß die Säule gänzlich mit Anionenaustauscharz gefüllt werden.

Bei- spiel	Bromäthan- sulfonsäure pro 464 g Pentaäthylen- hexamin	Mol Brom- äthansulfon- säure pro Atom N	Haupt-pH- Gebiet vgl. Beispiel 5
4 a	376	0,2	8,5-10
4 b	752	0,4	5,5- 8,0
4 c	1130	0,6	3,0- 5,0

### Beispiel 5 (Elektrophorese)

#### a) Allgemeine Methodik

60 Liter des 2%igen Reaktionsgemisches, das gemäß Beispiel 2c aus 446 g Pentaäthylenhexamin und 726 g

Tabelle I

	Kammer-Nr.								
	3	4	5	6	7	8	9	10	
pH des Inhalts	10,4	9,6	8,2	7,5	7,3	6,8	6,6	6,5	

	Kammer-Nr.								
	11	12	13	14	15	16	17	18	19
pH des Inhalts	6,4	6,2	6	5,7	5,3	4,6	4,2	3,5	3,0

Die Gefäßinhalte werden nunmehr aufgrund ihres pH in 7 Fraktionen zusammengefaßt und in entsprechenden Behältern gesammelt. Die Art und Aufteilung und der prozentuale Anteil am Gesamtvolumen sind in Tabelle II zusammengestellt:

Tabelle II

Fraktion Nr.	pH	Vol-%
1	2 - 3,4	6
2	3,5- 6,9	32
3	7 - 7,9	22
4	8 - 8,9	18
5	9 - 9,9	12
6	10 -10,9	8
7	11 -11,9	2

Wenn ein anderes Mengenverhältnis der Komponenten gewählt wurde als das in Beispiel 2c (0,5 Mol

Propansulton (0,5 Mol Propansulton pro Atom N) erhalten wurde, kam zur Reinigung desselben von nichtamphoteren Substanzen in ein mehrkammriges Elektrophoresegerät. Dies besteht aus einer länglichen Wanne aus Polyvinylchlorid mit rechteckigem Querschnitt (Länge 600 mm, Breite 400 mm, Höhe 300 mm), in welche in regelmäßigen Abständen 20 Platten aus porösem Ton eingekittet sind, so daß 21 gleich große Kammern mit einem Plattenabstand von etwa 30 mm entstehen. In die beiden äußeren Kammern sind Kohleelektroden eingehängt, in die Anodenkammer selbst wird 1%ige Phosphorsäure eingefüllt, in die Kathodenkammer 1%ige Natronlauge. Die restlichen Kammern werden 20 mm hoch gleichmäßig mit dem Reaktionsgemisch beschickt. In jede Kammer wird nun eine Kühlschlange aus Glas eingehängt, durch die Leitungswasser geleitet wird.

#### b) Erstelektrophorese

Nunmehr wird eine Gleichspannung von etwa 200 V angelegt, die im Laufe von 8 Stunden bis auf 1000 V gesteigert wird. Der elektrische Widerstand während der Elektrophorese nimmt fortwährend ab. Die durch die Kammer geschickte elektrische Leistung beträgt während des gesamten Versuches konstant etwa 200 W. Nach Ende des Versuches werden die Kammern in einzelne Gefäße entleert und das pH gemessen.

Man sieht, daß der pH in diesem Falle hauptsächlich im Gebiet 3,5-8 liegt. Die Verteilung ergibt sich im einzelnen aus Tabelle I:

Propansulton pro Atom N) aufgeführt, so schlägt dies auch in der prozentualen Zusammensetzung der Fraktionen bei der Erstelektrophorese nieder, ohne daß sich dabei in den prinzipiellen Eigenschaften der Fraktionen etwas ändert. Dasselbe gilt für die in Beispiel 3 beschriebenen Ansätze 3a und 3b.

#### c) Zweitelektrophorese

Die Fraktionen der Erstelektrophorese werden nun erneut einer Elektrophorese unterworfen mit dem Unterschied, daß nach Steigerung auf 800 V nochmals bei 300 V über Nacht weiter elektrophoretisiert wird und anschließend 2 Stunden bei 1000 V nachbehandelt wird. Die Kammern werden, ganz wie nach der Erstelektrophorese, in einzelne Gefäße entleert und das pH gemessen. Anschließend werden die Gefäßinhalte wiederum aufgrund ihres pH in Fraktionen zusammengefaßt, deren Zahl diesmal 10 beträgt und die jeweils nur eine einzige pH-Einheit umfassen. Die prozentualen Anteile am Gesamtvolumen sind in Tabelle III zusammengestellt:

Tabelle III

Fraktion Nr.	pH	Vol-%
1	2- 2,9	2
2	3- 3,9	5
3	4- 4,9	14
4	5- 5,9	15
5	6- 6,9	18
6	7- 7,9	20
7	8- 8,9	16
8	9- 9,9	18
9	10-10,9	8
10	11-11,9	2

## d) Weitere Aufarbeitung

Aus diesen nachstehend als 1-pH-Fraktionen der Zweitelektrophorese bezeichneten Schnitten werden Ampholyte hergestellt, die nur einen schmalen Bereich aufweisen. Die mengenmäßige Verteilung dieser 1-pH-Fraktionen ergibt sich speziell für den Fall der Reaktion von 0,5 Mol Propansulton pro Atom N aus Tabelle III.

Die Lösungen können in der vorliegenden Konzentration (ca. 2%) unmittelbar für die Elektrophorese verwendet werden. Für die Aufbewahrung und den Versand ist es zweckmäßiger, das Material auf einen Gehalt von ca. 40% einzuziehen, was im Rotationsverdampfer unter Vakuum einer Wasserstrahlpumpe ohne weiteres möglich ist. Durch Röhren des so gewonnenen Konzentrates mit fein gepulverter Aktivkohle in der Kälte über Nacht kann das gelblichgefärbte Material weitgehend aufgehellt werden, insbesondere die Lichtabsorption bei 260 und 280 nm abgesenkt werden.

Beispiel 6  
(Elektrophorese)

Die bei der praktischen Ausführung der isoelektrischen Fokussierung für Feintrennungen benötigten Ampholyte sollen erfahrungsgemäß am besten einen pH-Bereich von 2 Einheiten aufweisen. Solche Schmalbereich-Ampholyte können ohne weiteres durch Mischen der 1-pH-Fraktionen der Zweit-Elektrophorese erhalten werden. Grundsätzlich wählt man dabei die Volumenverhältnisse 50:50; jedoch kann man sich darauf nicht verlassen, sondern muß die pH-Verteilung längs des Teststreifens messen, wie es auf Seite 5 beschrieben und in Fig. 1 veranschaulicht ist. Kriterium für einen brauchbaren 2-pH-Schnitt ist dann eine möglichst weitgehend im gesuchten pH-Bereich liegende geradlinig verlaufende pH-Verteilung.

Die in den Kurven in Fig. 1 zugrunde gelegten Schmalbereich-Ampholyte sind durch 50:50 (V/V) Mischung der 1-pH-Fraktionen der Erstelektrophorese erhalten worden, nämlich

□ 1-pH-Fraktionen (2-2,9) + (3-3,9),  
Hauptbereich 2-4

○ 1-pH-Fraktionen (5-5,9) + (6-6,9),  
Hauptbereich 5-7

▽ 1-pH-Fraktionen (7-7,9) + (8-8,9),  
Hauptbereich 7-10

Es können sich nach diesen Testergebnissen durchaus auch andere Mischungsverhältnisse als zweckmäßiger erweisen. So weist etwa bei der Kurve □ (Hauptbereich 7-10), der langsame Anstieg im sauren Bereich auf einen unerwünschten Überschuss an Pufferkapazität im Bereich pH 6-8 hin, der durch Veränderung des Mischungsverhältnisses auf etwa 30 Volum-%, pH 8-8,9, mit 70 Volum-%, pH 9-9,9 bereinigt werden könnte. Hereinnehmen von 10 bis 20% der 1-pH-Fraktionen der Zweit-Elektrophorese 10-10,9 könnte das Bild sogar noch günstiger machen.

Es muß berücksichtigt werden, daß die Zusammensetzung der 1-pH-Fraktionen der Zweit-Elektrophorese im tatsächlichen Herstellungsprozeß Schwankungen unterliegt, denn es läuft, abhängig von den Anforderungen des Marktes, Material aus verschiedenen Synthesätzen nach 2a bis 2c (Beispiel 2) sowie 3a bis 3b (Beispiel 3) zusammen, welches gesammelt wird. Dies und die auch nicht immer vollkommen reproduzierbar laufenden Trennungen im Elektrophoresegerät nach Beispiel 5 machen die Herstellung der Ampholyte zu einem Prozeß, der nicht vollständig nach einem strengen Syntheschema abläuft, sondern eine auf Erfahrung und ständige Überwachung anhand der Teststreifen beruhende »handwerkliche« Komponente aufweist.

Beispiel 7  
(Vergleichsversuch)

In der Technik der isoelektrischen Fokussierung werden auch Ampholytgemische gebraucht, die bei der Elektrophorese einen möglichst breiten pH-Bereich entfalten sollen, um damit alle Proteine zu umfassen, die in der Natur vorkommen, also etwa mit dem Bereich 2-11.

Zur Herstellung eines solchen Breitbandampholyten wird eine Hauptfraktion hergestellt durch Synthese nach 2c (Beispiel 2) und Behandlung nach Beispiel 5, wobei die Fraktionen der Erst-Elektrophorese von 3,5-6,9 und 7-7,9 in dem dort anfallenden Mengenverhältnis, also etwa 60:40 vereinigt werden. Dazu kommen 10 Volum-% eines nach Beispiel 6 zusammengestellten Schmalbereich-Ampholyten mit dem Hauptbereich 10-11,9. Wiederum sind diese Mischungsverhältnisse nicht starr, sondern müssen aufgrund der pH-Verteilung längs des Teststreifens und auch aufgrund der tatsächlichen Trennleistung bei der fokussierenden Elektrophorese gegebenenfalls um einige Prozente modifiziert werden. Auch hier werden die bereits auf 40% eingezogenen und entfärbten Fraktionen miteinander gemischt, so daß sie nach Überprüfung des pH-Verlaufes im Teststreifen (z. B. Fig. 2, Kurve 2) verwendungsfähig sind.

Die mittels eines nach diesem Beispiel hergestellten Ampholytgemisches durchgeführte fokussierende Elektrophorese eines Testgemisches (Zusammensetzung derselben auf Seite 6) ergibt sich aus dem Vergleichsversuch.



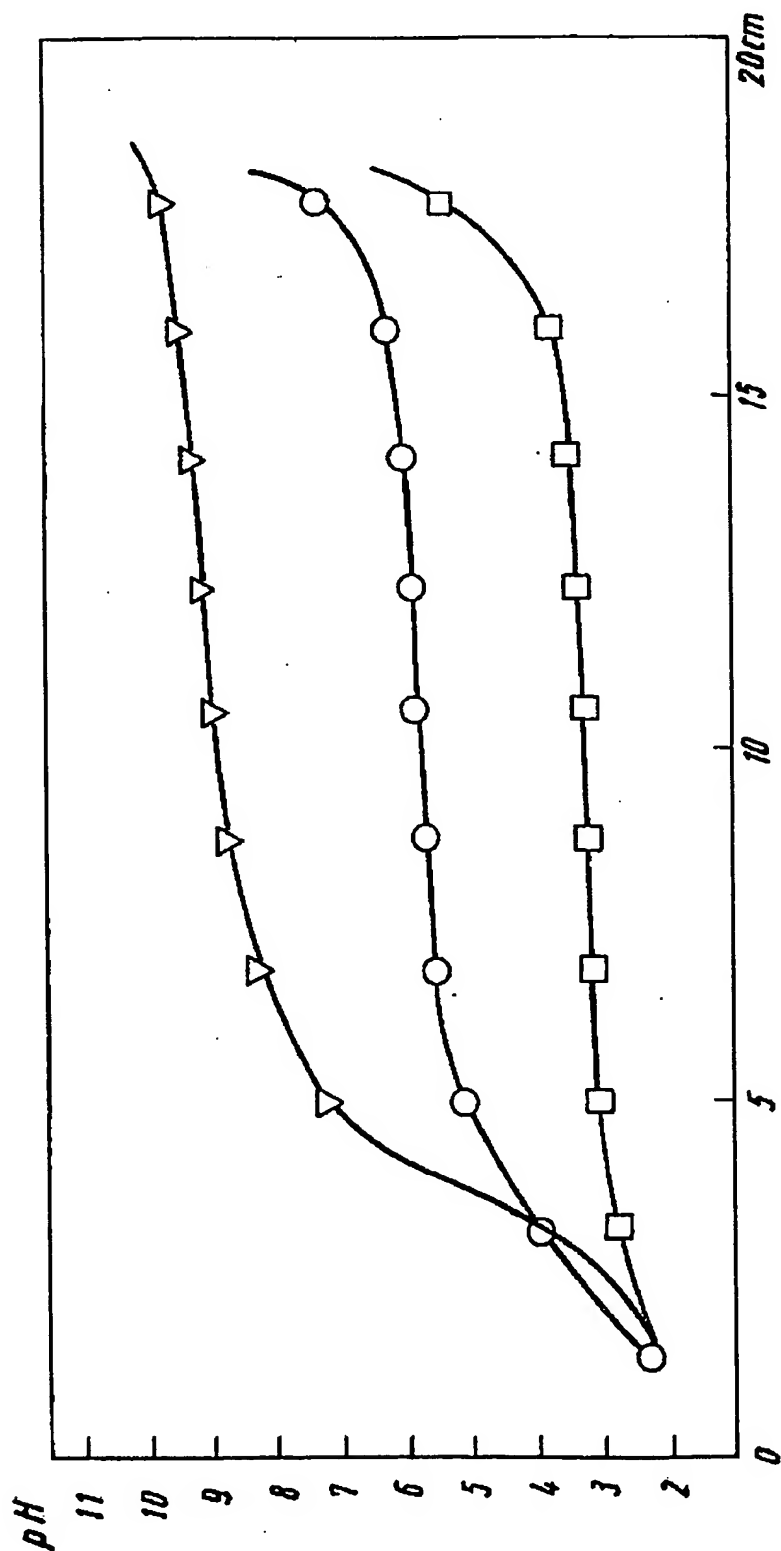


Fig. 1

pH-Verteilung längs des Teststreifens  
 Ampholyte mit schmaltem pH-Bereich

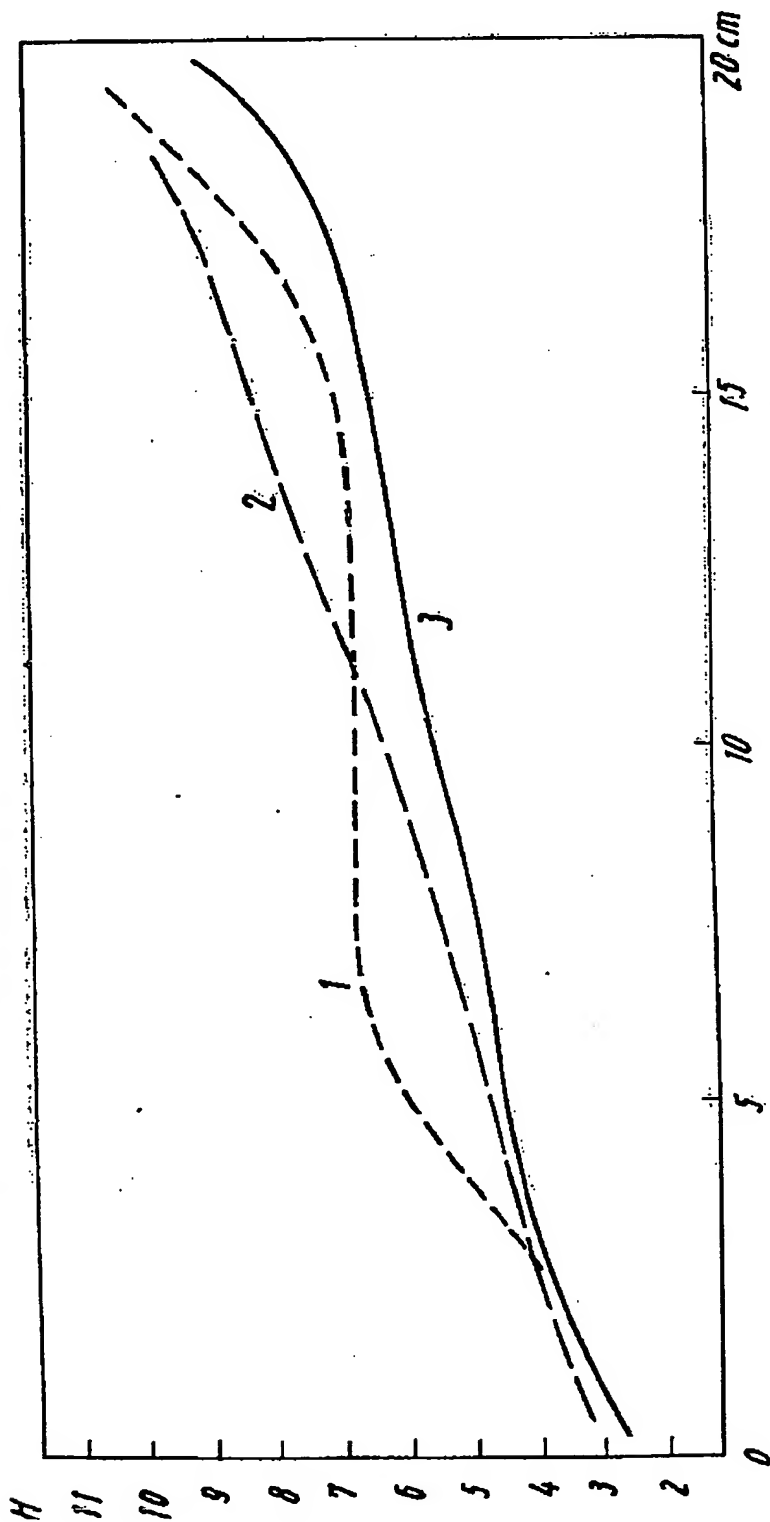


Fig. 2

pH-Verteilung längs des Teststreifens

Ampholyte mit breitem pH-Bereich

1. pH-Gradient nach 2 Stunden 200 V

2. pH-Gradient nach 4 Stunden 200 V

1 Stunde 400 V

1 Stunde 800 V

3. pH-Gradient nach weiteren 6 Stunden bei 800 V